

AU QUICKEL K E JR; SELDEN R; CALDWELL J R; NORA N F; SCHAFFNER W  
SO APPL MICROBIOL, (1971) 22 (3), 446-450.  
CODEN: APMBAY. ISSN: 0003-6919.

L22 ANSWER 239 OF 280 CAPLUS COPYRIGHT 1999 ACS  
AU Watanakunakorn, Chatrchai; Browder, Henry P.  
SO J. Infec. Dis. (1970), 121(2), 124-8  
CODEN: JIDIAQ

L22 ANSWER 246 OF 280 BIOSIS COPYRIGHT 1999 BIOSIS DUPLICATE 111  
AU GUNN L C; HENGESH J  
SO Rev. Surg., (1969) 26 (3), 214.  
CODEN: RESUAR. ISSN: 0034-6780.

L22 ANSWER 252 OF 280 MEDLINE DUPLICATE 115  
AU Zygmunt W A; Harrison E F; Browder H P; Tavormina P A  
SO APPLIED MICROBIOLOGY, (1968 Aug) 16 (8) 1174-8.  
Journal code: 6K0. ISSN: 0003-6919.

L22 ANSWER 259 OF 280 CAPLUS COPYRIGHT 1999 ACS  
AU Pulverer, G.  
SO Z. Med. Mikrobiol. Immunol. (1968), 154(1), 49-53  
CODEN: ZMMIA3

~~L22 ANSWER 260 OF 280 CAPLUS COPYRIGHT 1999 ACS~~  
AU Pulverer, G.  
SO Z. Med. Mikrobiol. Immunol. (1968), 154(1), 40-8  
CODEN: ZMMIA3

Thank you

## Untersuchungen mit Lysostaphin.

### II. Lysostaphin-Empfindlichkeit von 230 Staph. aureus-Stämmen tierischer Herkunft

G. PULVERER

Hygiene-Institut der Universität zu Köln

Eingegangen am 27. Juli 1967

#### *Studies on Lysostaphin*

#### *II. Sensitivity of 230 Staph. aureus-strains of Animal Origin to Lysostaphin*

**Summary.** The activity of Lysostaphin on 228 of 230 Staph. aureus-strains of animal origin was the same as seen on staphylococci of human origin. No relations could be found to the origin of the strains and to their resistance against other antibiotics. Two strains, however, were resistant to 100,0 µg/ml of Lysostaphin. These two strains themselves were seen to have lytic effects against many other staphylococci.

**Zusammenfassung.** In der vorliegenden Arbeit wird die Lysostaphin-Empfindlichkeit von 230 Staph. aureus-Stämmen tierischer Herkunft (in 14 Instituten aus 22 verschiedenen Tierarten angezüchtet) geprüft. Übereinstimmend mit den Testergebnissen bei Staphylokokken menschlicher Herkunft können 228 der 230 Tier-Staphylokokken als gut Lysostaphin-empfindlich bezeichnet werden. Zwei weitere Stämme sind allerdings Lysostaphin-resistent, womit das Vorkommen von Staph. aureus-Stämmen mit einer Lysostaphin-Resistenz nachgewiesen erscheint. Entsprechende Schlußfolgerungen werden diskutiert.

Die Wirksamkeit von Lysostaphin ist unseres Wissens bei Staph. aureus-Stämmen tierischer Herkunft noch nicht überprüft worden. In unserer zweiten Mitteilung soll daher über die Ergebnisse einer Lysostaphin-Testung bei 230 koagulasepositiven Staphylokokken aus dem Tierreich berichtet werden.

#### Material und Methodik

Die 230 koagulasepositiven Staphylokokkenstämme wurden in 14 Instituten Deutschlands und Frankreichs aus 22 verschiedenen Tierarten angezüchtet [siehe 11, 13, 14, 16]. Die Stämme einer Tierart stammen stets aus verschiedenen Instituten, z. B. wurde die 102 Rinder-Staphylokokken in 10 Instituten isoliert. Damit glauben wir auch hier ein repräsentatives Material vorlegen zu können.

Die Methodik blieb unverändert und ist bereits in der ersten Mitteilung ausführlich besprochen worden. Gewertet wurden auch hier nur die 48 Std.-Ergebnisse, da sie zum Teil schlechter waren als die 24 Std.-Resultate (190mal gleich, 35mal eine Stufe, viermal zwei Stufen und einmal drei Stufen schlechter). Als Inoculum verwendeten wir eine mittlere Staphylokokken-Einsaat (durchschnittlich  $7,7 \cdot 10^6$  Staphylokokken/ml).

## Ergebnisse

In der Tab. 1 haben wir die Lysostaphin-Empfindlichkeit der 230 Tier-Staphylokokken ihrer Herkunft gegenübergestellt. 102 Stämme wurden von Rindern angezüchtet, 44 Stämme aus Hasen, 25 aus Hühnern, 8 aus Hunden, je 7 aus Schweinen und Rebhühnern und 6 Staphylokokken aus Pferden. Die restlichen 31 Stämme wurden aus weiteren 15 Tierarten isoliert. Auffällige Besonderheiten in der Lysostaphin-Empfindlichkeit

Tabelle 1. Lysostaphin-Empfindlichkeit und Herkunft von 230 *Staph. aureus*-Stämmen tierischer Herkunft (isoliert aus 22 Tierarten)

Herkunft	Zahl	Minimale Hemmkonzentration in µg/ml							
		>10,0	5,0	2,5	1,25	0,62	0,31	0,15	0,037
Rinder	102	—	—	2	7	21	29	31	12
Hasen	44	—	—	—	4	11	12	13	4
Hühner	25	—	—	—	3	6	5	8	3
Hunde	8	—	—	1	1	—	3	3	—
Schweine	7	—	—	1	1	2	—	2	1
Rebhühner	7	1	—	—	—	—	4	1	—
Pferde	6	—	—	—	1	2	1	2	—
übrige Tierarten	31	1	1	1	1	6	9	9	3
zusammen	230	2	1	5	18	48	63	69	23

bei Staphylokokken bestimmter Tierarten sind nicht nachzuweisen. Die minimalen Hemmwerte (MIC) liegen bei den meisten Stämmen (180 der 230 Stämme) bei Lysostaphin-Konzentration zwischen 0,15 und 0,62 µg/ml. 23 Staphylokokken werden bei 0,075 µg/ml gehemmt, ein Stamm sogar bei 0,037 µg/ml. 18 Stämme haben einen MIC-Wert von 1,25 µg/ml, 5 weitere Stämme von 2,5 µg/ml und ein Stamm sogar von 5,0 µg/ml. Aus dem Rahmen fallen lediglich die beiden Tier-Staphylokokkenstämme Al 102 und Al 156 mit einer Lysostaphin-Resistenz von über 10,0 µg/ml. Der Stamm Al 102 wurde aus einem Rebhuhn angezüchtet und hat die folgenden Merkmale: Eigelb-positiv, Fibrinolysin-negativ, Hyaluronidase-positiv, Pigmentbildner, Hämolysinbildner, fermentiert Mannit aerob und anaerob, resistent gegen Penicillin G, schwache Lysisreaktion mit Phagen aus der Gruppe I. Der Stamm Al 156, der aus einer Taube isoliert wurde, zeigt die folgenden Eigenschaften: Eigelb-negativ, Fibrinolysin-negativ, Hyaluronidase-negativ, weißpigmentiert, Hämolysinbildner, fermentiert Mannit weder aerob noch anaerob, empfindlich gegen die gebräuchlichen Antibiotica, mit den Phagen des Internationalen Basissatzes keine Lysisreaktionen. Von beiden Stämmen haben wir je fünf Einzelkolonien geprüft, wobei in allen Fällen sogar bei Lysostaphin-Konzentrationen von 100,0 µg/ml noch Wachstum vorlag. Eine Überprüfung dieser Ergebnisse von anderer Seite ist eingeleitet.

Tabelle 2. Lysostaphin-Empfindlichkeit von *Staph. aureus*-Stämmen

P	S	C	T	E	Zahl	Minimale Hemm-		
						>10,0	5,0	2,5
+	+	+	+	+	156	1	1	3
R	+	+	+	+	40	1	—	1
R	R	+	R	+	9	—	—	—
R	+	+	R	+	8	—	—	—
übrige					17	—	—	1
zusammen					230	2	1	5

+ empfindlich; R resistent; P Penicillin; T = Tetracyclin; E = Erythromycin

Die Lysostaphin-Empfindlichkeit der antibiotica-Resistenz sind in der Tab. 2 ist das Gros der Tier-Staphylokokken (Streptomycin, Chloramphenicol, Tetracyclin, 230 Stämme), 40 Stämme sind Penicillin G und Chloramphenicol resistent. Die restlichen 17 Stämme wurden in weiteren Antibiotogrammen. Auch hier ist die Verteilung der MIC-Werte auf die verschiedenen Tierarten gleichmäßig.

## Diskussion

Übereinstimmend mit den in Tab. 1 Testergebnissen bei *Staph. aureus* erwiesen sich auch die Tier-Staphylokokken. 180 der 230 geprüften Stämme hatten Konzentrationen zwischen 0,15 und 0,62 µg/ml. 23 Stämmen lagen die MIC-Werte zwischen 0,075 und 0,037 µg/ml bis zu drei Verdünnungsstufen höher. Die Bactericidie-Konzentrationen lagen sie eine Stufe höher, viermal höher bei Verdünnungsstufen. Auch hier waren die Ergebnisse zu sehen, die wir ebenfalls der Tab. 1 entnehmen konnten. Die Lysostaphin-Empfindlichkeit der Herkunft der Staphylokokken

Zwei der 230 *Staph. aureus*-Stämme erwiesen sich als Lysostaphin-resistent. Der Stamm Al 102, der aus einer Taube isoliert wurde, hatte einen MIC-Wert von über 10,0 µg/ml, bei Prüfung von 100,0 µg/ml. Der eine resistente Stamm wurde aus einer Taube. Beide Stämme

Tabelle 2. *Lysostaphin-Empfindlichkeit und Antibiotica-Resistenz von 230 Staph. aureus-Stämmen tierischer Herkunft*

P	S	C	T	E	Zahl	Minimale Hemmkonzentration in µg/ml								
						>10,0	5,0	2,5	1,25	0,62	0,31	0,15	0,075	0,037
+	+	+	+	+	156	1	1	3	12	37	38	47	17	—
R	+	+	+	+	40	1	—	1	4	5	17	11	—	1
R	R	+	R	+	9	—	—	—	—	—	4	4	1	—
R	+	+	R	+	8	—	—	—	2	3	1	1	1	—
übrige					17	—	—	1	—	3	3	6	4	—
zusammen					230	2	1	5	18	48	63	69	23	1

+ empfindlich; R resistent; P Penicillin G; S Streptomycin; C Chloramphenicol; T = Tetracyclin; E = Erythromycin.

Die Lysostaphin-Empfindlichkeit der 230 Stämme und ihre Antibiotica-Resistenz sind in der Tab. 2 gegenübergestellt. Wie zu erwarten, ist das Gros der Tier-Staphylokokken empfindlich gegen Penicillin G, Streptomycin, Chloramphenicol, Tetracyclin und Erythromycin (156 der 230 Stämme), 40 Stämme sind Penicillin G-resistent, 8 weitere Stämme unempfindlich für Penicillin G und die Tetracycline sowie 9 Stämme dreifachresistent. Die restlichen 17 Staphylokokken verteilen sich auf neun weitere Antibiotigramme. Auch hier lassen sich keine Parallelen feststellen, die Verteilung der MIC-Werte auf die verschiedenen Antibiotigramme erscheint gleichmäßig.

#### Diskussion

Übereinstimmend mit den in der ersten Mitteilung diskutierten Testergebnissen bei Staph. aureus-Stämmen menschlicher Herkunft erwiesen sich auch die Tier-Staphylokokken als gut sensibel für Lysostaphin. 180 der 230 geprüften Stämme wurden durch Lysostaphin-Konzentrationen zwischen 0,15 µg/ml und 0,62 µg/ml gehemmt, bei 24 Stämmen lagen die MIC-Werte niedriger, bei weiteren 24 Stämmen bis zu drei Verdünnungsstufen höher. Bei 210 der Stämme waren die Bactericidie-Konzentrationen identisch mit den MIC-Werten, 14mal lagen sie eine Stufe höher, viermal zwei Stufen und zweimal drei Verdünnungsstufen. Auch hier waren nicht selten „Springer“ im Röhrchentest zu sehen, die wir ebenfalls dem Inoculum-Effekt zuschreiben möchten. Die Lysostaphin-Empfindlichkeit der Stämme war unabhängig von der Herkunft der Staphylokokken und ihrer Antibiotica-Resistenz.

Zwei der 230 Staph. aureus-Stämme tierischer Herkunft erwiesen sich als Lysostaphin-resistent. Ihre Lysostaphin-Hemmwerte lagen über 10,0 µg/ml, bei Prüfung von Einzelkolonien sogar über 100,0 µg/ml. Der eine resistente Stamm wurde aus einem Rebhuhn angezüchtet, der zweite aus einer Taube. Beide Stämme werden von uns als Staph. aureus

angesprochen, da sie die vom Staphylokokken-Subkomitee für Taxonomie [22] festgelegten Merkmale erfüllen: grampositive Haufenkokken, Catalase-positiv, aerobe und anaerobe Fermentierung von Glucose in dem vom Subkomitee angegebenen Medium [siehe 22], völlige Koagulation von Kaninchenplasma im Röhrchentest innerhalb von 24 Std.

Mit der Auffindung dieser beiden Lysostaphin-resistenten Stämme ist uns anscheinend das erste Mal der Nachweis gelungen, daß zumindest bei einigen wenigen Staph. aureus-Stämmen mit einer Lysostaphin-Unempfindlichkeit auch in vivo zu rechnen ist. BROWDER u. Mitarb. [2] gelang dagegen nur die Isolierung einer Lysostaphin-unempfindlichen Mutante des Staph. aureus-Stammes „Copenhagen“ im Labor. Zu bemerken ist, daß eine Lysostaphin-Unempfindlichkeit offenbar bei Staph. epidermidis-Stämmen ebenfalls vorkommt [20]. Worauf diese Lysostaphin-Resistenz bei Staph. aureus-Stämmen beruht und ob sie eventuell nur bei Stämmen tierischer Herkunft zu finden ist, muß heute noch offen bleiben. In diesem Zusammenhang erscheinen jedenfalls unsere Beobachtungen interessant, daß bei beiden Lysostaphin-resistenten Stämmen ein wachstumshemmender Effekt gegen andere Staph. aureus-Stämme besteht. Untersuchungen in dieser Richtung wurden eingeleitet.

Den medizinisch-technischen Assistentinnen Frau B. AXER u. Frä. I. ZUR MÜHLEN sei an dieser Stelle für ihre unermüdliche Mitarbeit herzlich gedankt.

#### Literatur

1. BROWDER, H. P., W. A. ZYGMUNT, J. R. YOUNG, and P. A. TAVORMINA: Lysostaphin: enzymatic mode of action. Biochem. biophys. Res. Commun. 19, 383—389 (1965).
2. — — and P. A. TAVORMINA: Lysis of micrococaceae by lysostaphin. Bact. Proc. 1966, A 82.
3. CROPP, C. B., and E. F. HARRISON: The in vitro effect of lysostaphin on clinical isolates of staphylococcus aureus. Canad. J. Microbiol. 10, 823—828 (1964).
4. FRITSCH, D., u. G. PULVERER: Methicillinresistente Staphylokokken. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 199, 170—180 (1966).
5. GROVE, D. C., and W. A. RANDALL: Assay methods of antibiotics. A laboratory manual. New York: Medical Encyclopedia, Inc. 1955.
6. GRÜN, L., u. G. PULVERER: Ergebnisse einer Differenzierung von Staphylokokken des Phagtyps „80“. Z. Hyg. Infekt.-Kr. 146, 385—396 (1960).
7. — — Vergleichende Untersuchungen an pathogenen Staphylokokken aus Eiterungsprozessen und aus Sektionsmaterial. Z. med. Mikrobiol. u. Immunol. 153, 1—12 (1966).
8. HARRISON, E. F., and C. B. CROPP: Comparative in vitro activities of Lysostaphin and other antistaphylococcal antibiotics on clinical isolates of Staphylococcus aureus. Appl. Microbiol. 13, 212—215 (1965).
9. — — Therapeutic activity of Lysostaphin in experimental staphylococcal infections. Canad. J. Microbiol. 13, 93—97 (1967).
10. HAWIGER, J., and J. JELJASZEWICZ: Sensitivity of Staphylococcus aureus to Lysostaphin, Cephalotin, Benzyl Penicillin and semi-synthetic Penicillins. Proceedings Vth International Congress of Chemotherapy, Vienna (Austria), Vol. III, pp. 35—37 (1967).
11. PULVERER, G.: Pathogene Staphylokokke land. Bedeutung biologischer Reaktologie und der Virulenz. Habilitationss.
12. — — Lysotypie der Staphylokokken. In G. Praxis. Stuttgart: Wiss. Verlagsges. m
13. — — Vergleich pathogener Staphylokokken Abt. Orig. 201, 27—41 (1966).
14. — — Studies on classification of animal coag Mikrobiol. t. V, z. 2, 429—433 (1966).
15. — —, u. D. FRITSCH: Bestehen Zusamm Resistenz, der Phaggruppzugehörig Fermentspektrum pathogener Staphy 64—76 (1965).
16. — —, u. A. LUCAS: Versuche zur Differenz tierischer Herkunft. Z. med. Mikrobic
17. SCHINDLER, CH. A.: Staphylococcal str sensitivity. Nature (Lond.) 209, 1368-
18. — —, and V. T. SCHUHARDT: Lysostaphin: Staphylococcus. Proc. nat. Acad. Sci.
19. — — Purification and properties of Lyso coccus aureus. Biochem. biophys. Act
20. SCHUHARDT, V. T.: Diskussionsbemerku (1965).
21. — —, and CH. A. SCHINDLER: Lysostaphin-tl coccus aureus. J. Bact. 88, 815—816
22. Subcommittee on Taxonomy of Staphyloc tions. Int. Bull. bact. Nomencl. 15, 11
23. TIPPER, D. J., and J. L. STROMINGER: Is Acetylglucosamine and 4-o-β-N,6-o-D and the structure of the cell wall poly Biochem. biophys. Res. Commun. 22,
24. ZYGMUNT, W. A., H. P. BROWDER, and Lysostaphin, Neomycin, and Bacitrac J. Microbiol. 12, 204—206 (1966).
25. — — — Growth inhibition of unusual Lysostaphin and other antistaphyloc 12, 341—345 (1966).
26. — — — Influence of blood and serum Lysostaphin. J. Bact. 91, 725—728 (1
27. — — E. F. HARRISON, and H. P. BROWDER staphin and Penicillins against Bacteri aureus. Appl. Microbiol. 13, 491—493

11. PULVERER, G.: Pathogene Staphylokokken bei Mensch und Tier sowie im Freiland. Bedeutung biologischer Reaktionen für die Aufklärung der Epidemiologie und der Virulenz. Habilitationsschrift, Köln 1963.
12. — Lysotypie der Staphylokokken. In GRÜN: Staphylokokken in Klinik und Praxis. Stuttgart: Wiss. Verlagsges. m. b. H. 1964.
13. — Vergleich pathogener Staphylokokken von Mensch und Tier. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. **201**, 27—41 (1966).
14. — Studies on classification of animal coagulase-positive staphylococci. Postepy Mikrobiol. t. V, z. 2, 429—433 (1966).
15. —, u. D. FRITSCH: Bestehen Zusammenhänge zwischen der Penicillin G-Resistenz, der Phaggruppzugehörigkeit, der Antigenstruktur und dem Fermentspektrum pathogener Staphylokokken? Z. Hyg. Infekt.-Kr. **151**, 64—76 (1965).
16. —, u. A. LUCAS: Versuche zur Differenzierung pathogener Staphylokokken tierischer Herkunft. Z. med. Mikrobiol. u. Immunol. **152**, 353—361 (1966).
17. SCHINDLER, CH. A.: Staphylococcal strains with relation to Lysostaphin sensitivity. Nature (Lond.) **209**, 1368—1369 (1966).
18. —, and V. T. SCHUHARDT: Lysostaphin: a new bacteriolytic agent for the Staphylococcus. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **51**, 414—421 (1964).
19. — — Purification and properties of Lysostaphin — a lytic agent for Staphylococcus aureus. Biochem. biophys. Acta (Amst.) **97**, 242—250 (1965).
20. SCHUHARDT, V. T.: Diskussionsbemerkung. Ann. N. Y. Acad. Sci. **128**, 19—24 (1965).
21. —, and CH. A. SCHINDLER: Lysostaphin-therapy in mice infected with Staphylococcus aureus. J. Bact. **88**, 815—816 (1964).
22. Subcommittee on Taxonomy of Staphylococci and Micrococci: Recommendations. Int. Bull. bact. Nomencl. **15**, 109—110 (1965).
23. TIPPER, D. J., and J. L. STROMINGER: Isolation of 4-o- $\beta$ -N-Acetylmuramyl-N-Acetylglucosamine and 4-o- $\beta$ -N,6-o-Diacetylmuramyl-N-Acetylglucosamine and the structure of the cell wall polysaccharide of Staphylococcus aureus. Biochem. biophys. Res. Commun. **22**, 48—56 (1966).
24. ZYGMUNT, W. A., H. P. BROWDER, and P. A. TAVORMINA: In vitro effect of Lysostaphin, Neomycin, and Bacitracin on Staphylococcus aureus. Canad. J. Microbiol. **12**, 204—206 (1966).
25. — — — Growth inhibition of unusual strains of Staphylococcus aureus by Lysostaphin and other antistaphylococcal antibiotics. Canad. J. Microbiol. **12**, 341—345 (1966).
26. — — — Influence of blood and serum on the antistaphylococcal activity of Lysostaphin. J. Bact. **91**, 725—728 (1966).
27. — E. F. HARRISON, and H. P. BROWDER: Microbiological activities of Lysostaphin and Penicillins against Bacteriophage 80/81 strains of Staphylococcus aureus. Appl. Microbiol. **13**, 491—493 (1965).

Priv.-Doz. Dr. med. G. PULVERER  
 Oberarzt am Hygiene-Institut  
 der Universität zu Köln  
 5000 Köln-Lindenthal  
 Fürst Pückler-Str. 56